



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 18643—2021  
代替 GB/T 18643—2002

---

## 鸡马立克氏病诊断技术

Diagnostic techniques for Marek's disease

2021-04-30 发布

2021-11-01 实施

---

国家市场监督管理总局  
国家标准化管理委员会 发布

## 目 次

前言 .....	I
引言 .....	II
1 范围 .....	1
2 缩略语 .....	1
3 临床诊断 .....	1
4 病毒分离 .....	3
5 琼脂免疫扩散试验检测 .....	4
6 PCR 检测 .....	6
7 荧光定量 PCR(q-PCR)检测 .....	7
8 综合判定 .....	8
附录 A (规范性附录) 病毒分离用溶液配制 .....	9
附录 B (规范性附录) 琼脂免疫扩散试验用溶液配制 .....	11
附录 C (规范性附录) PCR 检测用引物、反应条件及溶液配制 .....	12
附录 D (规范性附录) q-PCR 检测用引物、探针和反应条件 .....	15

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 18643—2002《鸡马立克氏病诊断技术》。本标准与 GB/T 18643—2002 相比主要技术变化如下：

- 修改了鉴别诊断部分的描述(见 3.4, 2002 年版的 3.4)；
- 增加了病毒分离检测方法(见第 4 章, 附录 A)；
- 增加了 PCR 检测方法(见第 6 章, 附录 B)；
- 增加了荧光定量 PCR 检测方法(见第 7 章, 附录 C)。

本标准的修订参考了 OIE《陆生动物诊断实验和疫苗标准手册》(2017 版), 并结合国内外技术研究新成果, 与国际先进技术保持一致。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位: 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、中国动物卫生与流行病学中心。

本标准主要起草人: 刘长军、龚振华、张艳萍、路平、王笑梅、李阳、高玉龙、祁小乐、李凯、王志亮。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB/T 18643—2002。

## 引 言

鸡马立克氏病(Marek's disease, MD)是一种鸡的高度传染性、以淋巴细胞增生为特征的肿瘤性疾病,由鸡疱疹病毒 2 型(Gallid herpesvirus 2, GaHV-2),即鸡马立克氏病病毒(Marek's disease virus, MDV)引起。MD 一般发生于 3 周龄以上的禽只,多发生于 12 周龄~30 周龄。MD 可引起多种严重的病症,其中淋巴组织增生是最常见也是最重要的一种。经典型 MD 主要侵害神经组织,死亡率很少超过 10%~15%,可持续数周至数月。急性型 MD 可使发病鸡内脏器官产生淋巴瘤,发病率一般为 10%~30%,暴发流行时发病率可高达 70%。死亡率可能在数周内迅速增加,然后死亡停止,也可能在数月内保持稳定的死亡率,并逐渐下降。目前,最常见的是产生广泛内脏器官淋巴瘤的急性型 MD。

MD 在临床诊断上容易与鸡的其他肿瘤性疾病,禽白血病(Avian leukosis, AL)和禽网状内皮组织增生病(Reticuloendotheliosis, RE),发生混淆。一般需要通过流行病学和病理组织学进行鉴别诊断。MD 可通过活疫苗免疫预防,免疫属于非清除性免疫,不能清除病原,也不能阻止环境中 MDV 野毒的感染和感染鸡排毒。由于 MD 疫苗普遍应用,以及疫苗的自身特点,临床上 MD 疫苗毒株的接种和野毒株的感染情况复杂,需要实验室诊断技术进行确诊。

从感染鸡组织中分离 MDV 可用于该病的检测。通常选用从抗凝血样中分离的淋巴细胞、肾细胞或脾细胞悬液作为分离病毒用的材料,也可以用骨髓组织浆液作为 MDV 分离材料。细胞悬液或骨髓组织浆液可接种鸡肾细胞(Chicken kidney cells, CKC)、鸭胚成纤维细胞(Duck embryo fibroblast, DEF)或鸡胚成纤维细胞(Chicken embryo fibroblast, CEF)进行病毒分离。应用琼脂免疫扩散试验(Agar gel immunodiffusion, AGID)对骨髓 MDV 抗原进行血清学检测,可以确定 MDV 感染。AGID 是检测抗体最常用的方法,然而由于 MD 疫苗毒株也可以刺激机体产生相应的抗体,抗体的检测对于 MD 的临床诊断仅具有参考价值。PCR(Polymerase chain reaction, PCR)方法可以用于检测 MDV, PCR 法还可以鉴别 MDV 血清 I 型野毒株和疫苗毒株。

# 鸡马立克氏病诊断技术

## 1 范围

本标准规定了鸡马立克氏病临床诊断,以及病毒分离、琼脂免疫扩散试验、PCR 检测和荧光定量 PCR 检测等实验室检测的技术要求和综合判定。

本标准适用于鸡马立克氏病的检测、诊断、检疫和流行病学调查等。

## 2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AGID:琼脂免疫扩散试验(Agar gel immunodiffusion)

AL:禽白血病(Avian leukosis)

CEF:鸡胚成纤维细胞(Chicken embryo fibroblast)

CKC:鸡肾细胞(Chicken kidney cells)

DEF:鸭胚成纤维细胞(Duck embryo fibroblast)

CPE:致细胞病变效应(Cytopathic effect)

DEF:鸭胚成纤维细胞(Duck embryo fibroblast)

DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic acid)

EB:溴化乙锭(Ethidium bromide)

FBS:胎牛血清(Fetal bovine serum)

LL:禽淋巴性白血病(Lymphoid leukosis)

M199:M199 培养基(M199 Medium)

MD:鸡马立克氏病(Marek's disease)

MDV:鸡马立克氏病病毒(Marek's disease virus)

PCR:聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate-buffered saline buffer)

RE:禽网状内皮组织增生病(Reticularendotheliosis)

## 3 临床诊断

### 3.1 临床症状

在鸡群中,病鸡临床症状表现为严重消瘦,瘫痪且两腿前后伸展呈“劈叉”姿势,皮肤毛囊结节以及眼盲症等,一般可以作为 MD 的示病症状,可初步推测为 MD。

### 3.2 剖检变化

#### 3.2.1 内脏型

内脏型 MD 的病理变化为肝、性腺、脾、肾、肺、前胃及心脏出现广泛的弥漫性淋巴瘤。青年鸡的肝脏一般中度肿大,但成年鸡肝脏严重肿大。

### 3.2.2 神经型

神经型 MD 的病理变化为外周神经肿胀,呈半透明水肿样,色泽变淡,横纹消失,其肿胀程度一般为正常神经的 2 倍~3 倍。这些变化多发生在腰荐神经丛、坐骨神经丛、臂神经丛、颈部迷走神经丛等部位。由于多为不对称性,通过比较对侧神经将有助于判定。

### 3.2.3 皮肤型

皮肤型 MD 病理变化比较少见。其病理变化特征为:以皮肤的羽毛囊为中心,形成半球形隆起的肿瘤,其表面有时可见鳞片状棕色痂皮。

### 3.2.4 眼型

眼型 MD 是由于淋巴细胞浸润虹膜而导致的病理变化,虹膜呈环状或斑点状褪色,出现淡灰色;瞳孔不规则,有时偏向虹膜一侧。

## 3.3 病理组织学变化

采集病鸡肿胀的外周神经和内脏的肿瘤组织样品,按常规方法制备石蜡切片、苏木素伊红染色,通过普通光学显微镜进行病理组织学观察判定。

根据病变组织中浸润细胞的种类及形态学,外周神经病理组织学变化可分为 A、B、C 三个型。在同只鸡的不同神经可能会出现不同的病变型。A 型病变以淋巴母细胞,大、中、小淋巴细胞及巨噬细胞的增生浸润为主。B 型病变表现神经水肿,神经纤维被水肿液分离,水肿液中以小淋巴细胞、浆细胞和许旺氏细胞增生为主。C 型病变为轻微的水肿和轻度小淋巴细胞增生。

内脏和其他组织的肿瘤与 A 型神经病变相似。通常以出现大小各异的淋巴细胞增生为主。

## 3.4 鉴别诊断

### 3.4.1 与禽白血病(Avian leukosis, AL)鉴别诊断

AL 在病理剖检中容易与缺乏外周神经病变的内脏型 MD 相混淆。一般需要通过流行病学和病理组织学进行鉴别诊断。常见的 AL 包括由 A、B 亚群白血病病毒引起的禽淋巴性白血病(Lymphoid leukaemia, LL)和由 J 亚群白血病病毒引起的髓细胞瘤白血病。

在流行病学方面,AL 一般发生于 16 周龄以上的鸡,多发生于 24 周龄~40 周龄之间。而 MD 的死亡高峰一般发生在 10 周龄~20 周龄之间。另外,LL 的发病率较低,一般不超过 5%,而 MD 的发病率较高。

LL 肿瘤病理组织学变化主要表现为大小均一的淋巴母细胞增生浸润。另外,在 LL 与 MD 引起的法氏囊肿瘤中,其肿瘤细胞的浸润部位存在着差异。MD 肿瘤细胞主要在滤泡间增殖,而 LL 肿瘤细胞则主要在滤泡内增殖。

J 亚群白血病病毒引起的肿瘤病主要包括髓细胞性、成红细胞性和成髓细胞性白血病,以及肾母细胞瘤、血管肉瘤和组织细胞性肉瘤病。前三者的主要表现是在受影响的组织器官内,可见显著的未成熟髓细胞的增殖。肿瘤细胞大小不一,核浆比高,呈现细胞多形性,细胞核呈椭圆形,个体较大且偏心分布,核膜增厚且不规则。核仁明显,染色质呈细密的点状或较大点状或浓染块状分布,并可见非典型的核分裂像。肿瘤细胞的细胞质中含有少量至多量的球形嗜酸性颗粒。J 亚群白血病病毒引起的髓细胞瘤白血病在病理组织学上易与 MD 区分。

### 3.4.2 与禽网状内皮组织增生病(Reticular endotheliosis, RE)鉴别诊断

尽管 RE 在不同的鸡群中感染率差异较大,但一般发病率较低。本病在病理组织学方面,RE 法氏

囊肿瘤主要表现为慢性 B 细胞性淋巴瘤,与淋巴细胞性白血病相似;非法氏囊肿瘤主要表现为 T 细胞性淋巴瘤,表现为形态相似的淋巴母细胞增殖,可能混杂有一部分小型淋巴细胞。

### 3.5 临床诊断判定

发病鸡符合 MD 临床症状和病理变化,判定为 MD 疑似病例。

## 4 病毒分离

### 4.1 试剂

4.1.1 磷酸盐缓冲液(PBS pH 7.4):配方见 A.1。

4.1.2 细胞培养液与细胞维持液:配方见 A.2。

4.1.3 淋巴细胞分离液。

4.1.4 SPGA/EDTA 缓冲液:配方见 A.3。

4.1.5 细胞冻存液:配方见 A.4。

### 4.2 器材

4.2.1 倒置显微镜。

4.2.2 超声波仪。

4.2.3 细胞培养箱。

4.2.4 微量可调移液器:(10  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$ ,50  $\mu\text{L}$ ~300  $\mu\text{L}$ )单道移液器。

4.2.5 手动或电动移液装置。

4.2.6 细胞培养皿。

### 4.3 细胞

4.3.1 鸡肾细胞。

4.3.2 鸭胚成纤维细胞。

4.3.3 鸡胚成纤维细胞。

### 4.4 操作方法

#### 4.4.1 病料处理

##### 4.4.1.1 淋巴细胞的分离

无菌采集疑似 MD 发病鸡的抗凝血,按照常规方法,利用淋巴细胞分离液分离。

##### 4.4.1.2 羽髓组织处理

无菌采集疑似 MD 发病鸡羽髓于离心管中,剪碎,加入 1 mL SPGA/EDTA 缓冲液,悬浮,悬浮液超声后用 0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜进行过滤。

#### 4.4.2 制备单层细胞

按常规法制备原代的 CKC 或 DEF 或 CEF,37  $^{\circ}\text{C}$  静置培养,形成单层细胞后用于病毒接种。

##### 4.4.3 接种细胞

将 0.2 mL 悬浮液用细胞维持液稀释至 1 mL 接种到单层细胞中(细胞培养皿的直径为 60 mm),将接种和未接种的对照细胞放在细胞培养箱中进行培养。羽髓组织悬液在接种细胞前,应倒掉细胞培养

液,加入羽髓组织悬液经 40 min 吸附后加入细胞维持液。每 2 d 换一次细胞维持液,若被检样品中含有 MDV,通常在 3 d~5 d 时出现 CPE,形成由圆形和梭形的折光性细胞和多核细胞组成的蚀斑,大约 7 d~10 d 时进行蚀斑计数。

#### 4.4.4 病毒继代或收获

每天观察并记录。7 d~10 d 后,视 CPE 情况,按常规方法继代或冻存细胞毒于液氮中。

#### 4.4.5 病毒鉴定

##### 4.4.5.1 血清学鉴定

应用标准抗原和阳性血清按 5.4.1 方法进行,中央孔加血清,检测分离毒抗原。

##### 4.4.5.2 分子生物学鉴定

按照 6.4 方法进行 PCR 检测。

#### 4.5 病毒分离检测结果判定

以 4.4.5 任何一种方法检测为阳性,都可以判定为 MDV 阳性。

### 5 琼脂免疫扩散试验检测

#### 5.1 概述

MD AGID 既可用于抗原的检测,也可以用于抗体的检测。在人工感染试验中,病毒抗原一般在 MDV 感染鸡 14 d~24 d 后可检测到;抗体一般在病毒感染 21 d 后可检测到。

#### 5.2 试剂

5.2.1 标准抗原:MDV 抗原由 MDV 标准强毒的细胞培养物制备。

5.2.2 标准阴、阳性血清:标准阴、阳性血清分别由 SPF 鸡和接种 MDV 标准强毒的细胞培养物的 SPF 鸡血清制备。

5.2.3 溶液配制

5.2.3.1 磷酸盐缓冲液(PBS pH 7.4):配方见 A.1。

5.2.3.2 1%硫柳汞溶液:配方见 B.1。

5.2.3.3 生理盐水:配方见 B.2。

5.2.3.4 琼脂平板的制备:配方见 B.3。

#### 5.3 器材

5.3.1 平皿。

5.3.2 打孔器。

5.3.3 针头。

#### 5.4 操作方法

##### 5.4.1 抗原(病原)检测

###### 5.4.1.1 打孔

在已制备的琼脂板上,用直径 4 mm 或 3 mm 直径的打孔器按六角形图案打孔,或用梅花形打孔器



打孔。中心孔与外周孔距离为 3 mm。将孔中的琼脂用针头挑出,应避免琼脂层脱离平皿底部。

#### 5.4.1.2 封底

用酒精灯火焰轻烤平皿底部至琼脂轻微融化为止,封闭孔的底部。

#### 5.4.1.3 加样

用微量移液器吸取用灭菌生理盐水稀释的标准阳性血清(按产品使用说明书的要求稀释),滴入中央孔。标准阳性抗原悬液分别加入外周相对的两孔中,在外周的其余孔中加入被检的羽髓浸出液。每孔均以加满不溢出为度,每加一个样品应换一个吸头。

#### 5.4.1.4 感作

加样完毕后,静置 5 min~10 min,将平皿轻轻倒置,放入湿盒内,置 37 °C 温箱中反应,分别在 24 h 和 48 h 观察结果。

#### 5.4.2 抗体检测

操作方法同 5.4.1,按如下操作加样:标准抗原液用灭菌生理盐水稀释(按产品使用说明书的要求稀释),用微量移液器吸取,滴入中央孔,标准阳性血清分别加入外周相对的两孔中,待检血清按顺序分别加入外周的其余孔中。每孔均以加满不溢出为度,每加一个样品应换一个吸头。

#### 5.5 结果判定

5.5.1 MD 琼脂免疫扩散试验结果判定示意图见图 1:

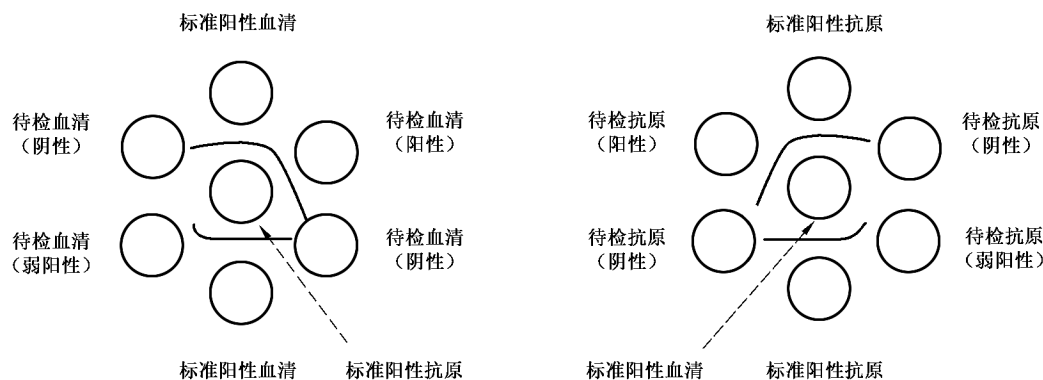


图 1 MD 琼脂免疫扩散试验结果判定示意图

5.5.2 将琼脂板置日光灯或侧强光下进行观察,当标准阳性血清与标准抗原孔间有明显沉淀线,表明阳性对照成立;在阳性对照成立情况下,当待检血清(或抗原)与标准抗原(或标准阳性血清)孔间有明显沉淀线,且此沉淀线与标准抗原和标准血清孔间的沉淀线末端相融合,则待检样品为阳性。

5.5.3 当标准阳性血清与标准抗原孔的沉淀线的末端在比邻的待检血清孔或待检抗原孔处的末端向中央孔方向弯曲时,待检样品为弱阳性。

5.5.4 当阳性对照成立,而待检血清(或抗原)与标准抗原(或标准阳性血清)孔之间无沉淀线,或标准阳性血清与抗原孔间的沉淀线末端向毗邻的待检血清孔或待检抗原孔直伸或向外侧偏弯曲时,该待检血清为阴性。

5.5.5 介于阴、阳性之间为可疑。可疑应重检,二次检测仍为可疑判为阳性。

## 6 PCR 检测

### 6.1 概述

针对 MDV 血清 1 型病毒特有的 meq 基因和 132 碱基重复序列(132 bpr)的 PCR 检测,可以对 MDV 血清 1 型病毒感染进行检测和鉴定;同时可以对野毒株和疫苗株感染加以区分。

### 6.2 试剂

6.2.1 阴性和阳性对照:分别为 SPF 鸡的组织 and MDV 强、弱毒细胞株培养物提取的核酸, -20 °C 保存。

6.2.2 组织细胞裂解液:为病毒总 DNA 提取试剂,配方见附录 C 中的 C.1。

6.2.3 苯酚,氯仿,异戊醇:均为分析纯。

6.2.4 75%乙醇:用无水乙醇和水配制, -20 °C 预冷。

### 6.3 器材

6.3.1 PCR 扩增仪。

6.3.2 台式低温高速离心机。

6.3.3 稳压稳流电泳仪和水平电泳槽。

6.3.4 凝胶成像仪(或紫外透射仪)。

6.3.5 -20 °C 冰箱。

6.3.6 微量可调移液器(0.5 μL~10 μL、5 μL~40 μL、40 μL~200 μL 和 200 μL~1 000 μL 各 1 支)。

6.3.7 PCR 扩增管。

### 6.4 操作方法

#### 6.4.1 样品准备

本方法适用所有的 MD 病原样品,包括羽髓、肝脏、脾脏、肾脏等器官,以及淋巴细胞与细胞培养物等。在无菌环境中,将采集的动物机体组织研磨,加 PBS 洗 2 次,12 000 g/min 离心 10 min,取沉淀用于提取总 DNA。细胞样品不需要研磨处理,直接用于提取总 DNA。

#### 6.4.2 核酸提取

##### 6.4.2.1 酚氯仿法

提取方法见 C.2。

##### 6.4.2.2 核酸提取等效方法

MDV 核酸提取可以采用细胞、血液和组织提取试剂盒,按照使用说明书操作。

#### 6.4.3 PCR 扩增

##### 6.4.3.1 扩增试剂的准备

在试剂配制区进行。设 PCR 反应数为  $n$ ,  $n$  为待检样品数+阳性对照+阴性对照,宜按  $n+1$  个反应进行配制,每个样本检测反应体系配制见 C.3。将上下游引物(见 C.4),Taq 酶,buffer,dNTP 和去离子水按照使用量加入到一个离心管中,混匀,每个 PCR 管中分装 19 μL,记录好待检样品管、阴性对照管、阳性对照管,转移至样本处理区。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/055023214211011234>